

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-207034

(43)Date of publication of application : 26.07.2002

(51)Int. Cl.

G01N 33/48

C12Q 1/02

G01N 15/14

G01N 21/47

G01N 33/49

(21)Application number : 2001-002880

(71)Applicant : SYSMEX CORP

(22)Date of filing : 10.01.2001

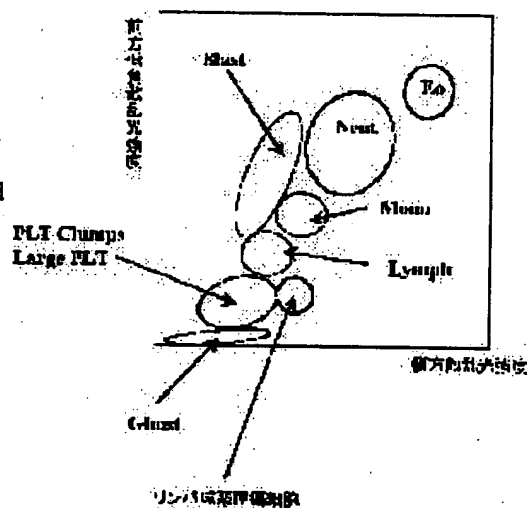
(72)Inventor : TSUJI TOMOHISA  
MIZUKAMI TOSHIHIRO  
KOKUNI SHINICHIRO

## (54) ANOMALOUS CELL DETECTING METHOD

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for detecting tumor cells with accuracy at a low cost in a short time.

**SOLUTION:** A sample is mixed with a hemolyzing agent for dissolving erythrocytes in a blood sample to a degree that does not interfere with measurements and bringing leucocytes and anomalous cells into a state suitable for the measurements. The prepared sample is measured by a flow cytometer to measure at least two scattered lights to obtain a two-dimensional distribution. From the two-dimensional distribution, normal leucocytes are classified into at least four and counted, and the distribution areas of lymphoid tumor cells, blood platelet aggregation, large-size blood platelets, and blast cells are set to detect each anomalous cell.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

☐ Generate Collection☐ Print

L10: Entry 6 of 13

File: DWPI

Jul 26, 2002

DERWENT-ACC-NO: 2003-049219  
DERWENT-WEEK: 200305  
COPYRIGHT 2003 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Abnormal cell detection method comprises generating two-dimensional distribution region from measurement data of reflected light from blood sample mixed with hemolysis agent

PRIORITY-DATA: 2001JP-0002880 (January 10, 2001)

## PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 2002207034 A	July 26, 2002		005	G01N033/48

INT-CL (IPC): C12 Q 1/02; G01 N 15/14; G01 N 21/47; G01 N 33/48; G01 N 33/49

ABSTRACTED-PUB-NO: JP2002207034A

## BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - The blood sample is mixed with the hemolysis agent containing the organic acid or its salt. Light is radiated on the sample and its reflected light is measured by the cytometer to generate the two-dimensional distribution region. Specific regions are set to detect the lymphocytic series tumor cell, large-sized blood platelets, blast cell from the two-dimensional distribution region.

USE - For detecting abnormal cell by using flow cytometry for diagnosis of the tumorigenic transformation in blood such as leukemia.

ADVANTAGE - Tumor cells are detected accurately in short time.

DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows the model of the scatter gram of leukocyte and abnormal cell. (Drawing includes non-English language text).

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-207034

(P2002-207034A)

(43) 公開日 平成14年7月26日 (2002.7.26)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
G 0 1 N 33/48		G 0 1 N 33/48	M 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	A 2 G 0 5 9
G 0 1 N 15/14		G 0 1 N 15/14	4 B 0 6 3
21/47		21/47	C
			Z

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-2880(P2001-2880)

(22) 出願日 平成13年1月10日 (2001.1.10)

(71) 出願人 390014960

シスメックス株式会社

神戸市中央区臨浜海岸通1丁目5番1号

(72) 発明者 辻 智彦

神戸市中央区臨浜海岸通1丁目5番1号

シスメックス株式会社内

(72) 発明者 水上 利洋

神戸市中央区臨浜海岸通1丁目5番1号

シスメックス株式会社内

(74) 代理人 100088867

弁理士 西野 卓嗣

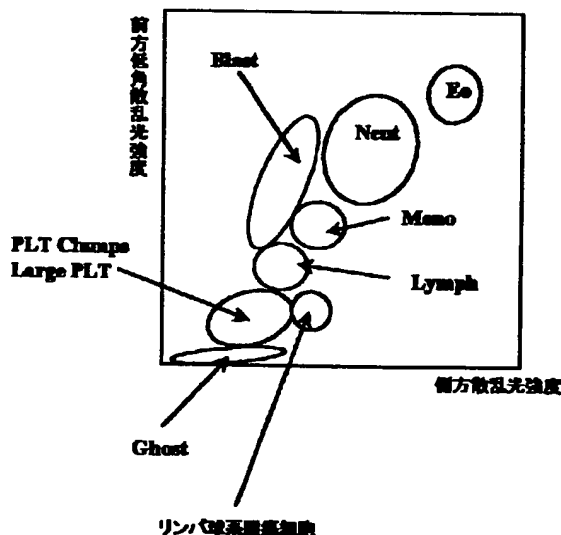
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異常細胞検出方法

(57) 【要約】

【課題】 短時間、低コストで、精度良く腫瘍細胞を検出する方法を提供する。

【解決手段】 試料を、血液試料中の赤血球を測定の際害とならない程度に溶解し白血球および異常細胞を測定に好適な状態にする溶血剤と混合し、調製した試料をフローサイトメーターで測定し、少なくとも2つの散乱光を測定して2次元分布を得、その2次元分布から、正常な白血球を少なくとも4つに分類計数し、リンパ球系腫瘍細胞、血小板凝集、大型血小板及び芽球の分布領域を設定し、各異常細胞を検出する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の工程からなる異常細胞検出方法；

(1) 試料を、血液試料中の赤血球を測定の障害とならない程度に溶解し、白血球および異常細胞を測定に好適な状態にする溶血剤と混合する工程

(2) (1)で調製した試料をフローサイトメーターで測定し、少なくとも2つの散乱光を測定する工程

(3) (2)で測定した個々の細胞の散乱光信号から異なる散乱光を2軸として、2次元分布を得る工程、

(4) 2次元分布から、正常な白血球を少なくとも4つ 10 に分類計数する工程

(5) 2次元分布から、リンパ球系腫瘍細胞の分布領域を設定し、リンパ球系腫瘍細胞を検出する工程

(6) 2次元分布から、血小板凝集または大型血小板の分布領域を設定し、血小板凝集または大型血小板を検出する工程

(7) 2次元分布から、芽球の分布領域を設定し、芽球を検出する工程。

【請求項2】 血液試料中の赤血球を測定の障害とならない程度に溶解し、白血球および異常細胞を測定に好適な状態にする溶血剤が、少なくとも1つのノニオン性界面活性剤と少なくとも1つのカチオン性界面活性剤であって、pHが4.5～11.0の間にある、請求項1記載の異常細胞検出方法。

【請求項3】 溶血剤が、少なくとも1つの芳香環を有する有機酸もしくはその塩を含有する請求項2に記載の異常細胞検出方法。

【請求項4】 散乱光の受光角度が、前方低角散乱光、前方高角散乱光、側方散乱光から選ばれる少なくとも2つである請求項1～3記載の異常細胞検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はフローサイトメトリによる異常細胞の検出に関する。

## 【0002】

【従来の技術】一般に白血病などの血液における腫瘍化の診断は、細胞表面に出現する抗原（表面マーカー）の測定や腫瘍化を特定する遺伝子の同定、顕微鏡観察による形態学的判定などを組み合わせて行われる。例えば、ATL（成人T細胞白血病）症例において血液中の腫瘍化細胞を検出するには、色素で標識したモノクローナル抗体を使用して疾患特異的に出現する表面抗原を検出する方法や特定の原因遺伝子（HTLV-I遺伝子）を検出する方法などがある。

【0003】近年、フローサイトメータの普及により、色素で標識したモノクローナル抗体を用いて、リンパ球などの細胞表面マーカーの測定が頻繁に行われている。この方法は、測定結果が得られるまでに時間を要する、種々の抗体を使用するためコストがかかるという欠点がある。

また、顕微鏡による形態学的観察では、種々の染色法と細胞形態とを組み合わせるが、一部の腫瘍細胞は、正常細胞と区別ができない、観察者によって結果が異なるなどの欠点が挙げられる。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、短時間、低コストで、精度良く腫瘍細胞を検出する方法を提供することを目的とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は以下の工程：

(1) 試料を、血液試料中の赤血球を測定の障害とならない程度に溶解し、白血球および異常細胞を測定に好適な状態にする溶血剤と混合する工程

(2) (1)で調製した試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも2つの散乱光を測定する工程

(3) (2)で測定した個々の細胞の散乱光信号から異なる散乱光を2軸として、2次元分布を得る工程、

(4) 2次元分布から、正常な白血球を少なくとも4つ 10 に分類計数する工程

(5) 2次元分布から、リンパ球系腫瘍細胞の分布領域を設定し、リンパ球系腫瘍細胞を検出する工程

(6) 2次元分布から、血小板凝集または大型血小板の分布領域を設定し、血小板凝集または大型血小板を検出する工程

(7) 2次元分布から、芽球の分布領域を設定し、芽球を検出する工程

からなる異常細胞検出方法を提供する。

## 【0006】

【発明の実施の形態】本発明でいう血液試料とは、末梢血液、骨髓液、尿、アフエーシスで採取した血液試料など、白血球を含む体液試料をいう。

【0007】本発明でいうリンパ球系腫瘍細胞とは、白血病によって腫瘍化したリンパ球のことをいう。

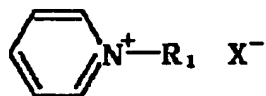
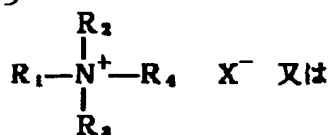
【0008】本発明でいう、血液試料中の赤血球を測定の障害とならないように溶解し、白血球及び異常細胞を測定に好適な状態にする溶血剤と混合する工程とは、血液試料を適当な溶血剤と混合する工程である。

【0009】本工程の目的は、赤血球を測定の障害とならないように溶解するだけである。この目的に使用する溶血剤は、少なくとも一つのカチオン性界面活性剤、少なくとも一つのノニオン性界面活性剤、pHを一定に保つための緩衝剤を含むpH4.5～11.0の水溶液である。

【0010】カチオン性界面活性剤としては、4級アンモニウム塩型界面活性剤又はピリジニウム塩型界面活性剤が好ましい。4級アンモニウム塩型およびピリジニウム塩型界面活性剤は、

## 【0011】

【化1】

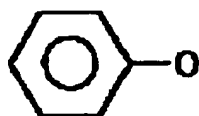


【0012】 $R_1$ は炭素数6～18のアルキル又はアルケニル基、 $R_2$ および $R_3$ は炭素数1～4のアルキル又はアルケニル基、 $R_4$ は炭素数1～4のアルキルおよびアルケニル基又はベンジル基、 $X$ はハロゲン原子である。〕で表される全炭素数9～30の界面活性剤が挙げられる。 $R_1$ の炭素数6～18のアルキル又はアルケニル基としてはヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル、テトラデシル等を挙げることができるが、とりわけオクチル、デシル、ドデシル等の直鎖のアルキル基が好ましい。また、 $R_2$ および $R_3$ の炭素数1～4のアルキル、アルケニル基としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル等を挙げることができるが、とりわけ、メチル、エチル、プロピル等の炭素数1～3のアルキル基が好ましい。さらに、 $R_4$ の炭素数1～4のアルキルおよびアルケニル基としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル等を挙げることができるが、とりわけ、メチル、エチル、プロピル等の炭素数1～3のアルキル基が好ましい。

【0013】ノニオン性界面活性剤としては以下の式のポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤が好ましい： $R_1 - R_2 - (CH_2CH_2O)_n - H$ 〔式中、 $R_1$ は炭素数8～25のアルキル、アルケニル又はアルキニル基； $R_2$ はO、

【0014】

【化2】



またはCOO； $n$ は10～50の整数を表す。〕

【0015】溶血剤の組成は特に限定されるものではないが、例えば、特開平6-20792号、特開平7-181177号に記載の溶血剤などが好適に使用される。

【0016】さらに、少なくとも1つの、分子内に1つの芳香環を有する有機酸を含有することは、白血球および異常細胞を分類に好適なように調整するために好適である。例えば、安息香酸、フタル酸、馬尿酸、サリチル酸、 $p$ -アミノベンゼンスルホン酸、ヘンゼンスルホン酸などが好適に使用できる。好ましくは0.1～100mM、より好ましくは1～50mM、さらに好ましくは10～30mMの濃度範囲で使用できる。

【0017】これらの有機酸を含有することにより、特に好酸球の散乱光強度が増加し、結果として、好中球と\*

\*好酸球の分離が改善される。

【0018】pHが4.5よりも低い場合、好酸球の分離が悪くなり、正常白血球を分画することが困難になる。pH11.0よりも高い場合は、白血球が損傷を受けやすくなり、好ましくない。

【0019】本発明でいう散乱光とは、一般に市販されるフローサイトメーターで測定できる散乱光であり、側方散乱光、前方低角散乱光（受光角度0～5度付近）、前方高角散乱光（5～20度付近）等をいい、白血球の大きさもしくは内部構造情報を反映する散乱角度が選ばれる。

【0020】異なる2つの散乱光の1つに前方散乱光（低角でも高角でもどちらでも良い）を使用すると、細胞の大きさに関する情報が得られる。

【0021】フローサイトメーターの光源は、特に限定されず、例えば、アルゴンイオンレーザー、He/Neレーザー、赤色半導体レーザー、水銀アークランプなどが使用される。特に半導体レーザーは気体レーザーに比べ非常に安価であり、装置コストを大幅に下げることができるため、好適である。

【0022】「測定した個々の細胞の散乱光信号から異なる散乱光を2軸として2次元分布を得る工程」とは、例えば、X軸に側方散乱光、Y軸に前方散乱光をとって2次元分布を描くことである。

【0023】「2次元分布から、正常な白血球を少なくとも4つに分類計数する工程」とは、例えば、X軸に側方散乱光、Y軸に前方散乱光をとって、2次元分布を描くと、図1に示すように、各白血球細胞は細胞毎に集団を形成する。この集団を適当な解析ソフトで解析することにより、各白血球集団の数と割合を算出する。

【0024】「2次元分布から、リンパ球系腫瘍細胞の領域を設定し、リンパ球系腫瘍細胞を検出する工程」とは、例えば、X軸に側方散乱光、Y軸に前方散乱光をとって、2次元分布を描くと、図1に示すように、リンパ球系腫瘍細胞は集団を形成する。この集団を適当な解析ソフトで解析することにより、リンパ球系腫瘍細胞集団の数を算出する。血小板凝集、大型血小板、芽球も同様にして、各集団の数を算出する。各集団の数にはそれぞれ閾値を設定しておき、その設定値を超えたらメッセージを表示する。

【0025】

【実施例】実施例1 リンパ球系腫瘍細胞出現例  
以下の組成の試薬を調製した。

HEPES（市販品）  
フタル酸2Na（市販品）

10mM  
20mM

BC30TX (ポリオキシエチレン(30)セチルエーテル)  
(日光ケミカルズ(株))  
ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド(市販品)  
NaOHでpHを7.0に調整。

1500ppm

550ppm

【0026】上記試薬1.0mlに抗凝固剤処理した健常者およびATL患者の血液をそれぞれ30 $\mu$ lずつ加え、35℃で40秒間反応させた後、フローサイトメータで前方低角散乱光、側方散乱光を測定した。光源は633nmの赤色半導体レーザを使用した。

【0027】図2にX軸に側方散乱光、Y軸に前方低角散乱光をとった健常人のスキヤットグラムを示す。

【0028】図3にX軸に側方散乱光、Y軸に前方低角散乱光をとったATL患者のスキヤットグラムを示す。リンパ球領域(Lymph)よりも前方散乱光強度の低い位置に集団が認められ、本法によりリンパ系腫瘍細胞であるATL細胞が検出できることが確認された。

【0029】実施例2 血小板凝集出現例  
実施例1の試薬1.0mlに抗凝固剤処理した血小板凝集が出現した血液をそれぞれ30 $\mu$ lずつ加え、35℃で40秒間反応させた後、フローサイトメータで前方低角散乱光、側方散乱光を測定した。光源は633nmの赤色半導体レーザを使用した。

【0030】図4にX軸に側方散乱光、Y軸に前方低角散乱光をとった血小板凝集のスキヤットグラムを示す。リンパ球領域(Lymph)とゴースト領域(Ghost)の間に集団が認められ(PLT Clumps)、本法により血小板凝集が検出できることが確認された。

【0031】実施例3 大型血小板出現例  
実施例1の試薬1.0mlに抗凝固剤処理した大型血小板が出現した血液をそれぞれ30 $\mu$ lずつ加え、35℃で40秒間反応させた後、フローサイトメータで前方低角散乱光、側方散乱光を測定した。光源は633nmの赤色半導体レーザを使用した。

【0032】図5にX軸に側方散乱光、Y軸に前方低角散乱光をとった大型血小板のスキヤットグラムを示す。\*

\*リンパ球領域(Lymph)とゴースト領域の間に集団(Ghost)が認められ(Large PLT)、本法により大型血小板が検出できることが確認された。

【0033】実施例4 芽球出現例

実施例1の試薬1.0mlに抗凝固剤処理した芽球が出現した血液をそれぞれ30 $\mu$ lずつ加え、35℃で40秒間反応させた後、フローサイトメータで前方低角散乱光、側方散乱光を測定した。光源は633nmの赤色半導体レーザを使用した。

【0034】図6にX軸に側方散乱光、Y軸に前方低角散乱光をとった芽球のスキヤットグラムを示す。単球領域(Mono)の左上方に集団が認められ(Blast)、本法により芽球が検出できることが確認された。

【0035】

【発明の効果】本発明によれば、短時間、低コストで、精度良く腫瘍細胞などの異常細胞を検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】白血球及び異常細胞のスキヤットグラムの模式図である。

【図2】本発明の実施例1における健常人のスキヤットグラムである。

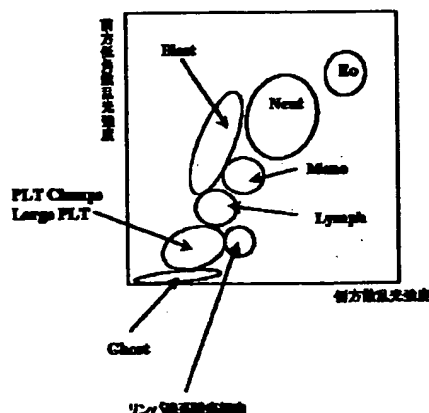
【図3】本発明の実施例1におけるATL患者のスキヤットグラムである。

【図4】本発明の実施例2における血小板凝集のスキヤットグラムである。

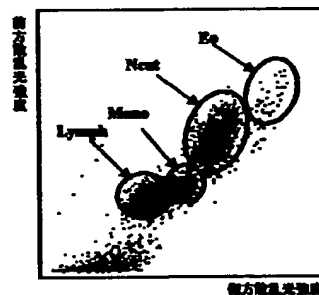
【図5】本発明の実施例3における大型血小板のスキヤットグラムである。

【図6】本発明の実施例4における芽球のスキヤットグラムである。

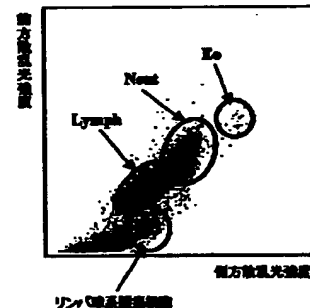
【図1】



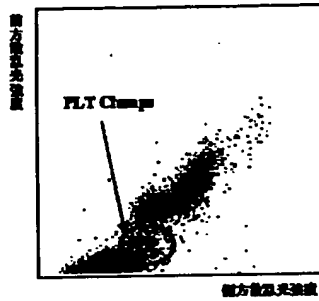
【図2】



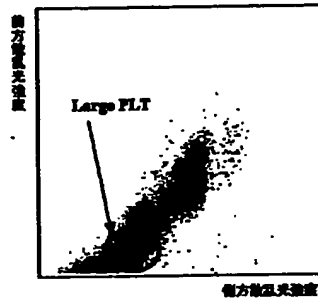
【図3】



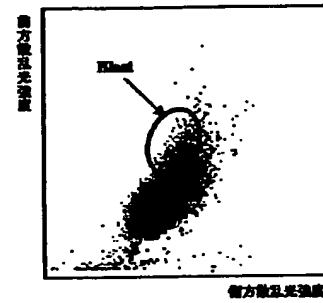
【図4】



【図5】



【図6】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/49

識別記号

F I

G 0 1 N 33/49

テームコード(参考)

H

(72)発明者 小国 振一郎

神戸市中央区臨浜海岸通1丁目5番1号

シスメックス株式会社内

Fターム(参考) 2G045 BB01 BB29 BB34 CA11 CA17

CA23 CA24 FA12 FA29 GC11

2G059 AA06 BB13 BB14 CC20 DD03

EE02 FF08 GG01 GG10 HH02

HH06

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QR52

QS36 QX02